

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 2 月 27 日 (27.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/015810 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/15, A61P 35/00, 13/08, 43/00, C12Q 1/02, 1/68
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044 大阪府 大阪市 中央区伏見町四丁目 2 番 1 4 号 藤村大和生命ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08355
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 20 日 (20.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-250846 2001 年 8 月 21 日 (21.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 笹川 由香 (SASAKAWA, Yuka) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 直江 吉則 (NAOE, Yoshinori) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MEDICINAL USE OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR AND METHOD OF EVALUATING ANTITUMOR EFFECT THEREOF

(54) 発明の名称: ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の医薬用途ならびにその抗腫瘍効果の評価方法

(57) Abstract: Remedies for prostatic cancer and malignant lymphoma comprising FK228 or its salt as the active ingredient; and a method of evaluating the antitumor effect of a histone deacetylase inhibitor characterized by comprising at least the step of treating test cells with the histone deacetylase inhibitor and the step of measuring a change in the expression of a specific gene in the test cells before and after the treatment with the inhibitor and comparing the expression doses thus measured.

(57) 要約:

FK 228 またはその塩を有効成分とする前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤、ならびに少なくとも、試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程と、該阻害剤の処理前ならびに処理後で該試験細胞における特定の遺伝子の発現変化を測定し、両者の発現量を比較する工程とを含むことを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法。

明細書

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の医薬用途ならびにその抗腫瘍効果の評価方法

技術分野

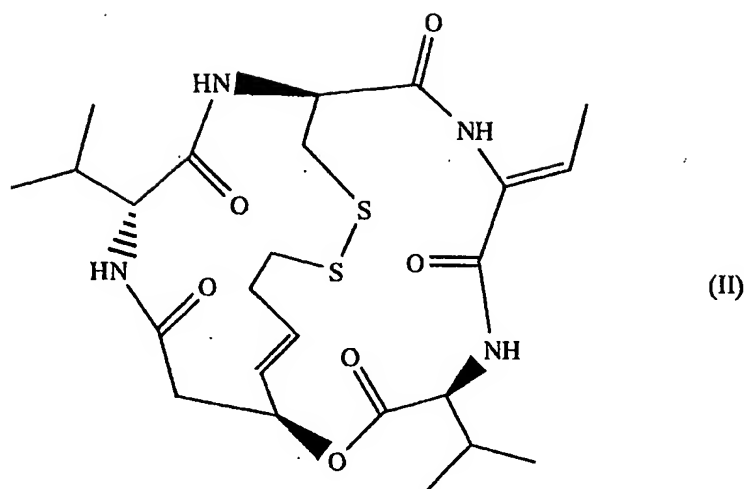
本発明は、前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤（T細胞リンパ腫を除く）、ならびにヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法に関する。

背景技術

近年、患者の個人差を考慮した「オーダーメイド医療」が重要視され、薬剤が効く癌、効かない癌を識別するためのマーカー探索が必要とされている。これは、薬剤が効くという可能性をあらかじめ検証してから患者に投薬することによって、
10 薬剤の奏効率をあげるとともに毒性を回避し、無意味な薬剤使用を抑制することで倫理的・医療的に薬剤治療のコストパフォーマンスを上昇させる試みである。また、癌治療においては、基礎研究と臨床の間の溝を埋める重要な手段となりうるため、抗癌剤の薬効を予測する方法の開発が望まれていた。

また、一般的に抗腫瘍活性を有するという報告のある物質や化合物において、
15 当該報告がインビトロのみに基づく結果である場合、かかる結果はインビボでの結果の予測に直接つながらないことが指摘されている。すなわち、インビトロで抗腫瘍活性を示す物質が、インビボでも抗腫瘍活性を示すとは限らず、インビトロで抗腫瘍活性を示す物質をそのまま抗癌剤として適用することは困難であるという問題である。

20 例えば、式（I I）



で表される化合物は、ヒストンデアセチラーゼを選択的に阻害することにより、強力な抗腫瘍活性を誘導することが報告されている（当該物質はさらにまた、該物質で処理した細胞にヒストンの高アセチル化を引き起こし、結果として、各種

5 遺伝子の転写調節活性、細胞周期阻害活性およびアポトーシス阻害活性を誘導する（特公平7-64872号公報、H. Nakajima ら, Exp. Cell Res. 241, 126-133 (1998)）ことも報告されている）。しかしながら、該化合物の抗腫瘍効果を予測できる因子を立証した報告はなく、インビトロでの結果がそのままインビボでも適用できるのか否か、どの腫瘍に対してもインビボで有用な効果を示すのか

10 否か、等解決すべき点が多く残されているのが現状である。

ヒストンデアセチラーゼは、活性中心にZnを配位したメタロ脱アセチル化酵素である（M. S. Finnin ら, Nature, 401, 188-193 (1999)）。本酵素は、各種アセチル化ヒストンのDNAに対する親和性を変化させると考えられている。これ

15 によってもたらされる直接的な生物現象は、クロマチン構造変化である。クロマチン構造の最小単位は、ヒストン8量体（H2A、H2B、H3及びH4、各2分子、コアヒストン）に、146bpのDNAが1.8回左巻きに巻き付いたヌクレオソームである。コアヒストンは、各ヒストンタンパク質のN末の正電価がDNAと相互作用することにより、ヌクレオソーム構造を安定化している。ヒス

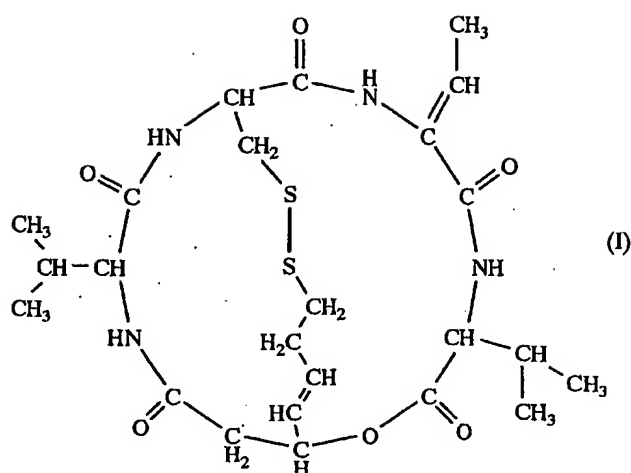
- トンのアセチル化は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼの関与するアセチル化反応とヒストンデアセチラーゼの関与する脱アセチル化反応の平衡関係により調節されている。ヒストンのアセチル化は、ヒストンタンパク質N末の進化的に良く保存されたりジン残基において起こり、これにより、コアヒストンタンパク
- 5 質は、N末の電価を失い、DNAとの相互作用が減弱され、ヌクレオソームの構造が不安定になると考えられている。従って、ヒストンの脱アセチル化は、この逆、すなわちヌクレオソーム構造の安定化に向かうと考えられている。しかしながら、アセチル化が、どの程度クロマチン構造を変化させるのか、また、それによって2次的に誘導される転写調節等とどの様に関係しているのかについては、
- 10 不明な点が多い。

発明の開示

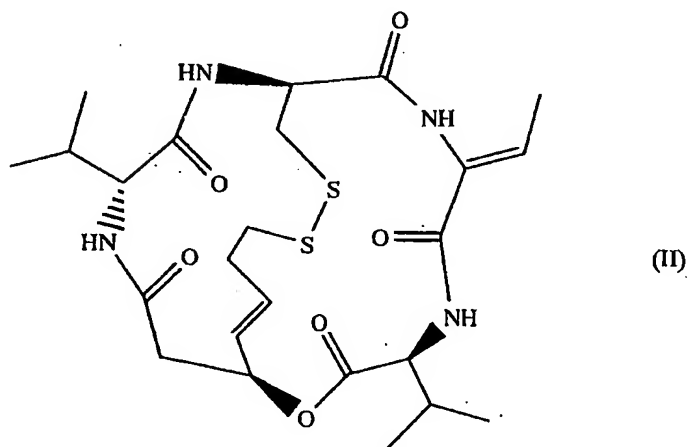
本発明の目的は、新規前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤を提供することにある。さらに本発明の別の目的は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を評価、予測する方法を提供することにある。

- 15 本発明者らは、上記問題を解決するために鋭意研究を行った結果、インビボでもその抗腫瘍効果を確認し得る前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤を見出した。さらに本発明者らは、腫瘍の種類によって、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の変動すること、さらに当該変動がある特定の遺伝子や蛋白質の発現状況の変化に連動して観察されることを見出し、かかる観察をもとにヒスト
- 20 ンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を評価する方法を確立して本発明を完成するに至った。すなわち本発明は以下の通りである。

(1) 式 (I)



で表される化合物（以下、FK 2 2 8とも称する；配列表配列番号5）、特に式
(I I)



5 で表される化合物（以下、FR 9 0 1 2 2 8とも称する）、またはその塩を有効成分として含有する前立腺癌治療剤、またはT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療剤。

（2）インビボにおける抗腫瘍作用を有することを特徴とする、上記（1）に記載の前立腺癌治療剤、またはT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療剤。

10 （3）FK 2 2 8、特に式FR 9 0 1 2 2 8と製剤上許容される担体とを含有する前立腺癌治療用医薬組成物、またはT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療用

医薬組成物。

(4) インビボにおける抗腫瘍作用を有することを特徴とする、上記(3)に記載の前立腺癌治療用医薬組成物、またはT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療用医薬組成物。

- 5 (5) 有効量のFK228、特に式FR901228を患者に投与することを含む前立腺癌またはT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫の治療方法。

(6) 前立腺癌治療剤、またはT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療剤の製造の為にFK228、特に式FR901228の使用。

- (7) 前立腺癌治療剤、またはT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療剤がイン
10 ビボで抗腫瘍作用を有するものである、上記(6)記載の使用。

(8) 上記(3)に記載の前立腺癌治療用医薬組成物および当該医薬組成物を前立腺癌の治療に使用し得るかまたは使用すべきであることを記載した書類を含む商業的パッケージ。

- (9) 上記(3)に記載のT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療用医薬組成物
15 および当該医薬組成物をT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫の治療に使用し得るかまたは使用すべきであることを記載した書類を含む商業的パッケージ。

- (10) 少なくとも、試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程と、該阻害剤の処理前ならびに処理後で該試験細胞における特定の遺伝子(または特定の蛋白質)の発現変化を測定し、両者の発現量を比較する工程とを含むこ
20 とを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法。

(11) 特定の遺伝子がp21遺伝子および/またはc-myc遺伝子である上記(10)に記載のヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法。

(12) 特定の蛋白質がp21および/またはc-mycである上記(10)に記載のヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法。

- 25 (13) ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が式FK228、特にFR901228で表される化合物、またはその塩である、上記(10)～(12)のいずれかに記載の抗腫瘍効果の評価方法。

(14) 上記(10)～(13)のいずれかに記載の抗腫瘍効果の評価方法を用いることを特徴とする、部位特異的な抗腫瘍活性を有するヒストンデアセチラーゼ阻害剤のスクリーニング方法。

(15) FK228の薬効予測の指標となり得る遺伝子を得る方法であって、少なくとも、

①FK228感受性腫瘍細胞およびFK228抵抗性腫瘍細胞をFK228で処理する工程、

②上記工程①で発現が増加、あるいは減少する遺伝子を選択する工程、

③上記工程②で選択された遺伝子について、さらに

10 (i) FK228での処理によりその発現が増加し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、

(ii) FK228での処理によりその発現が増加し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子、

(iii) FK228での処理によりその発現が減少し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは

15 (iv) FK228での処理によりその発現が減少し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子を選択する工程を含む方法。

図面の簡単な説明

20 図1は、FR901228のヒト前立腺癌に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。縦軸は腫瘍増殖率を、横軸は初回投与後の経過日数を示している。腫瘍増殖率は、Day 0における腫瘍体積を1としたときの、それ以後の腫瘍体積の相対的割合で表した。

図2は、FR901228のヒトリンパ腫に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。縦軸は生存マウスの割合を、横軸は腫瘍細胞移植後の経過日数を示している。

図3は、FR901228のヒト前立腺癌((a); PC-3)および腎

臓癌（（b）；ACHN）に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。縦軸は腫瘍増殖率を、横軸は初回投与後の経過日数を示している。腫瘍増殖率は、Day 0における腫瘍体積を1としたときの、それ以後の腫瘍体積の相対的割合で表した。

- 5 図4は、FR901228のインビトロにおけるp21遺伝子発現に対する作用を示すグラフである（PC-3細胞、ACHN細胞）。

（a），（b）；縦軸はp21遺伝子発現量を相対的に示したものであり、横軸はFR901228との接触時間（hr）を示している。

（c）；縦軸はp21遺伝子発現量を相対的に示したものである。

- 10 図5は、FR901228のインビボにおけるp21遺伝子発現およびc-myc遺伝子発現に対する作用を示すグラフである（PC-3細胞、ACHN細胞）。縦軸はp21あるいはc-myc遺伝子の発現量を相対的に示したものであり、横軸はFR901228を投与してからの経過時間（hr）を示している。

15 発明の詳細な説明

本発明の前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤は、有効成分として式（I）で表される化合物（FK228）またはその塩を含む。式（I）化合物の中でも、好ましくは式（II）で表される立体異性体である化合物（FR901228）である。これらの化合物は強力なヒストンデアセチラーゼ
20 阻害活性を有し（Nakajima, H.ら；上述（1998））、特にFR901228の方がより強いヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有することから、好適に本発明の前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤に含められる。

本明細書中、特に断りのない限り、単にFK228という場合には式（II）で表される化合物も含む、立体異性を問わない化合物群を意味する。

- 25 FK228またはその塩は、公知の物質であり、入手可能である。例えば、FK228の立体異性体の一つであるFR901228は、それを生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株を好気性条件下に培養、当該培養ブロスから当該

物質を回収することによって得ることができる。FR 901228を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株としては、例えばクロモバクテリウム・ビオラセウムWB 968 (FERM BP-1968) が挙げられる。FR 901228はより具体的には特公平7-64872号 (対応米国特許4977138号) 公報に記載のとおりにして当該生産菌から得ることができる。FR 901228は、より容易に入手できるという点で、FR 901228を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株からの回収が好ましいが、さらなる精製工程が不要あるいは少なくてすむという点で、合成あるいは半合成のFR 901228もまた有利である。同様にFR 901228以外のFK 228についても、従来公知の方法により半合成、全合成することができる。より具体的にはKhan W. Li, らによって報告されている方法 (J. Am. Chem. Soc., vol. 118, 7237-7238 (1996)) に準じて製造することができる。

FK 228の塩は生物学的に許容される通常無毒の塩であり、無機塩基との塩 (例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩)、有機塩基との塩 (例えばトリエチルアミン塩、ジイソプロピルエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩等の有機アミン塩)、無機酸付加塩 (例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等)、有機カルボン酸・スルホン酸付加塩 (例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等)、塩基性あるいは酸性アミノ酸 (例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等) との塩等の、塩基との塩または酸付加塩が挙げられる。

FK 228は、不斉炭素原子および二重結合に基づく光学異性体または幾何異性体等の立体異性体を有することがあるが (例えばFR 901228)、これらすべての異性体及びそれらの混合物もこの発明の範囲に含まれる。

さらに、FK 228、FR 901228またはそれらの塩の溶媒和化合物 (例

えば包接化合物（例えば水和物等）もこの発明の範囲に含まれる。

本発明において、インビボ、インビトロとは通常、当分野で用いられている用語どおりであり、すなわち、「インビボ」とは、対象とする生体の機能や反応が生体内で発現される状態を意味し、「インビトロ」とは当該機能や反応が試験管

5 内（組織培養系、細胞培養系、無細胞系等）で発現されることを意味する。

本発明の対象となる腫瘍は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤であるFK228が抗腫瘍効果を発揮する腫瘍であり、インビボでの効果が特に顕著な前立腺癌ならびに悪性リンパ腫が挙げられる。本発明の悪性リンパ腫治療剤が抗腫瘍効果を発揮する悪性リンパ腫は、好ましくはB細胞リンパ腫、組織球性リンパ腫等のT
10 細胞リンパ腫以外のものである。本発明は特にこれらの腫瘍に対し、インビボで、良好な抗腫瘍効果を示す。

本発明の前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤は、有効成分としてのFK228またはその塩を、経口または非経口適用に適した有機または無機の担体または賦形剤との混合物として含有する固体、半固体または液体形態の医薬製剤の
15 形で使用できる。該活性成分は、例えば、散剤、錠剤、ペレット剤、カプセル剤、坐剤、液剤、乳濁液、懸濁液、エアロゾル剤、スプレー剤、その他の使用に適した形態用の、通常の、無毒性で、医薬として許容しうる担体と混ぜ合わせることができる。更に、必要ならば、助剤、安定剤、増粘剤等を使用してもよい。これらの担体、賦形剤は必要に応じて無菌化処理を施したものを使用してもよく、ま
20 た製剤化した後に無菌化処理を行うこともできる。FK228またはその塩は、抗腫瘍効果を生じるのに十分な量を当該前立腺癌治療剤および悪性リンパ腫治療剤に含ませればよい。

該薬剤をヒトに適用するには、静脈内、筋肉内または経口投与によってこれを適用するのが好ましい。有効成分であるFK228またはその塩の治療上有効な
25 用量は、処置すべき個々の患者の年齢および状態、ならびに癌の種類や、悪性リンパ腫の種類によっても相違するが、通常、静脈内投与の場合には、ヒトの体表面積 m^2 あたりFK228の量で1日量0.1～100mg、好ましくは1～5

0 mg、更に好ましくは5～30 mgを投与して腫瘍を処置する。

本発明はまた、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法を提供する。当該方法を用いれば、標的とする腫瘍細胞において抗腫瘍効果を発揮することができるヒストンデアセチラーゼ阻害剤を、実際に人体に投与することなく

5 見出すことが可能となる。

「ヒストンデアセチラーゼ阻害剤」とは、ヒストンデアセチラーゼの活性部位に基質と競合して結合する化合物、またはヒストンデアセチラーゼの活性部位とは別の部位に結合してヒストンデアセチラーゼの酵素活性を変える作用を有する化合物を意図し、既にヒストンデアセチラーゼ阻害剤として、その用途が公知の
10 化合物を含め、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有することが報告されている全ての化合物（合成、天然を問わない）ならびに今後報告されるであろう全ての化合物を含む。具体的には、上述のFK228またはその塩やその誘導体（例えば、FK228をアセチル化したものやS-S結合を還元したチオール体等）が挙げられる。さらにトリコスタチンA、酪酸ナトリウム、suberoylanilide
15 hydroxamic acid (SAHA)、MS-275、Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide、Apicidin、Trapoxin等もヒストンデアセチラーゼ阻害活性が報告されている化合物である。

本発明のヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法は、少なくとも
も(i)試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程と、(ii)
20 該阻害剤の処理前ならびに処理後で該試験細胞における特定の遺伝子および／または蛋白質の発現変化を測定し、両者の発現量を比較する工程とを含む。以下各工程毎に詳細に説明する。

(i) 試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程

本工程はヒストンデアセチラーゼ阻害剤を含有する溶液中で試験細胞を培養する工程である。
25

本発明において使用する試験細胞としては、ヒストンデアセチラーゼを有する細胞であれば特に限定されないが、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果、

特に該阻害剤の腫瘍部位特異性を評価することも本発明の課題の一つであることから、使用する試験細胞は、その効果を調べたい腫瘍由来の細胞であることが好ましい。例えば、前立腺癌への効果を評価する場合には、ヒト前立腺培養癌細胞であるPC-3細胞等が用いられ、腎臓癌への効果を評価する場合には、ヒト培養腎臓癌細胞であるACHN細胞等が用いられる。これらの癌細胞を含め試験細胞として使用する各種培養ヒト癌細胞は、市販されているかあるいは、種々の細胞バンク等から入手可能である。また、長期的な治療効果、あるいは個々の患者に対する有効性、すなわちオーダーメイド医療を鑑みる上で、患者の腫瘍から得られ得る癌細胞を培養し、当該癌細胞を試験細胞として用いることも可能である。

10 本工程で使用するヒストンデアセチラーゼ阻害剤とは上述の通りである。

試験細胞とヒストンデアセチラーゼ阻害剤の処理条件は、当該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の効果が発揮されるに十分な条件下で実施されれば特に限定はなく、使用する試験細胞の種類や試験するヒストンデアセチラーゼ阻害剤の種類や量等の要因により適宜設定される。

15 ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を溶液にするための溶媒はヒストンデアセチラーゼ阻害剤を溶解することが可能で、且つ、試験細胞に対し毒性を示さない限り特に制限はなく、通常、エタノール、PEG400、10%HCO-60溶液、ジメチルスルホキシド等、およびそれらの混合溶媒等で濃縮液を調製してから、培養液や生理的緩衝液等で所望の濃度に希釈して使用する。溶液中のヒストンデアセチラーゼ阻害剤の濃度は、通常、0.001~1000nM、好ましくは0.01~100nM、特に好ましくは0.1~10nMであり、場合によっては、段階的に希釈し、希釈系列を作成し、それを用いることもある。

本発明の評価方法において、試験細胞を播種する個数は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤との処理時間等により適宜増減可能であるが、通常、培養液1mLあたり $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個程度である。

試験細胞とヒストンデアセチラーゼ阻害剤の処理時間（培養時間）は、該試験細胞や、該阻害剤の種類や濃度、その他の培養条件により適宜設定され、また、

評価の目的によっても異なり、通常1～100時間、好ましくは1～72時間である。また長期的な持続性のある抗腫瘍効果を確認したい場合には、比較的長めの処理時間が設けられる。該試験細胞は、通常、37℃、5%CO₂+95%O₂存在下で処理（培養）される。

- 5 (i i) 該阻害剤の処理前ならびに処理後で該試験細胞における特定の遺伝子および／または蛋白質の発現変化を測定し、両者の発現量を比較する工程

本工程は、試験細胞における特定の遺伝子および／または特定の蛋白質の発現量を観察することができるあらゆる方法により実施することができる。例えば以下のような手順が挙げられる。

- 10 ①ヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する前の試験細胞から、遺伝子、特にmRNA、または蛋白質を抽出する。

②上記(i)試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程、の項で詳述したように、試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で所定時間処理培養した後、当該処理細胞から上記①と同様にして遺伝子、特にmRNA、または蛋白質

- 15 抽出する。

③特定の遺伝子（または特定の蛋白質）に特異的に親和性を有する物質を用いて、該特定の遺伝子（または特定の蛋白質）の存在を検出する。ここで、特定の遺伝子（または特定の蛋白質）としては、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の処理前後でその発現量に変化があり、且つかかる発現量の変化と、該ヒストンデアセチラ

- 20 ーゼ阻害剤の有する抗腫瘍効果とに相関関係のあるものであり、具体的にはp21遺伝子（蛋白質）やc-myc遺伝子（蛋白質）が挙げられる。p21遺伝子は細胞周期の進行抑制に関与する細胞周期の調節遺伝子であり、その産物はサイクリン／サイクリン依存性キナーゼ複合体の活性を阻害し、細胞周期の進行をブロックすることが知られている。c-myc遺伝子は核内蛋白質をコードしており、その遺伝子発現は細胞増殖、細胞分化および癌化に伴い顕著に変化する。こ
- 25 のことから、その遺伝子産物の細胞増殖への関与が注目されている。

本発明において測定する特定の遺伝子（または特定の蛋白質）は、1種類の測

定でも十分に有用であるが、より詳細な抗腫瘍効果を知る必要がある場合には、2種以上の特定の遺伝子（または特定の蛋白質）を同時に測定することが好ましい。

- 特定の遺伝子または特定の蛋白質に特異的に親和性を有する物質としては、それらの試験細胞中での発現が検出できる程度の感度を有するものであれば特に制限されない。ここで、「特異的親和性」とは目的の遺伝子または蛋白質にのみハイブリダイズまたは結合する性質を意味する。特定の遺伝子を検出するための当該物質としては、当該遺伝子の全部もしくは一部に完全相補的なものが、もしくは上記性質を満たす範囲で1乃至数個のミスマッチを含んでいるものが挙げられる。具体的には当該遺伝子の塩基配列の全部もしくは一部、ならびにそれらの相補配列を含むオリゴまたはポリヌクレオチド等が挙げられ、検出すべき遺伝子の形態に応じて適宜選択する。かかる物質は当該遺伝子との特異的親和性を有している限りはその由来は特に限定されず、合成されたものであっても、当該遺伝子から必要な部分を切り出し、通常行なわれる方法によって精製されたものであってもよい。これらはまた蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。特定の蛋白質を検出するための当該物質としては、例えば当該蛋白質に特異的親和性を有する抗体またはその断片が挙げられ、その特異的親和性とは抗原・抗体反応により該蛋白質を特異的に認識し、結合する能力のことである。該抗体またはその断片は、当該蛋白質と特異的に結合可能なものであれば特に限定されず、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびそれらの機能的断片のいずれであってもよい。これらの抗体あるいはその機能的断片は、通常当分野で行なわれている方法によって製せられる。これらの抗体またはその断片は、蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。

- 試験細胞からの遺伝子、特にmRNAの抽出、ならびに蛋白質の抽出は、当分野で通常実施されている方法を用いて、また適宜組み合わせて実施することができる。mRNAを抽出した場合には、上記した特定の遺伝子に特異的親和性を有する物質を用いてノザンブロット、RT-PCR法等の当分野で通常行なわれる

手法を用いてその発現状況を調べる。一方、蛋白質を抽出した場合には、上記した特定の蛋白質に特異的親和性を有する物質（抗体またはその断片等）を用いてイムノブロット、ウエスタンブロット等の当分野で通常行なわれる手法を用いてその発現状況を調べる。

- 5 かくして、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を処理する前と処理した後での試験細胞における特定の遺伝子（または特定の蛋白質）の発現状況の変化を測定し、両者を比較することにより、試験したヒストンデアセチラーゼ阻害剤が試験した試験細胞に効果的に抗腫瘍活性を示すか否かを判断することができる。p 21 遺伝子（または蛋白質）を指標とした場合、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理
- 10 することによりその発現量が増加した場合に、該阻害剤はその試験細胞が由来する腫瘍に対し抗腫瘍効果を有すると判断する。また、c-myc 遺伝子（または蛋白質）を指標とした場合、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理することによりその発現量が減少した場合に、該阻害剤はその試験細胞が由来する腫瘍に対し抗腫瘍効果を有すると判断する。臨床的に腫瘍細胞を患者から採取したものを試験細胞として用いた場合には、個々の患者による個体特異性をも反映した抗腫瘍
- 15 効果の予測が可能となる。

- 本発明では、上述したようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法を利用して、腫瘍の部位（種類）特異的な抗腫瘍活性を有するヒストンデアセチラーゼ阻害剤のスクリーニング方法を提供することができる。対象となる
- 20 腫瘍由来の試験細胞を用い、また、その効果を調べようとするヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理し、上述の方法に従ってその抗腫瘍効果の有無を調べることにより、個々の阻害剤の腫瘍の部位特異性を判断することができる。

- さらに本発明はFK-228の薬効を予測する指標となる遺伝子を得る方法を提供し、かかる方法により得られる遺伝子（群）の発現状況を解析することにより、FK-228がその治療に有用であるか否か、あるいは対象とする癌がFK-228に有効であるか否か等の情報を得ることができ、「オーダーメイド医療」に
- 25 貢献することが可能となる。

当該方法は具体的には以下のようにして行う。

①FK 2 2 8感受性腫瘍細胞およびFK 2 2 8抵抗性腫瘍細胞をFK 2 2 8で処理する工程

ここでFK 2 2 8感受性腫瘍細胞とは、FK 2 2 8によって腫瘍細胞の増殖が抑制され得るタイプの腫瘍細胞をいい、例えば、後述する実施例からも示されるように前立腺癌細胞PC-3が挙げられる。また、他に胃癌の細胞であるS C-6もFK 2 2 8感受性腫瘍細胞の1種である。一方FK 2 2 8抵抗性腫瘍細胞とは、FK 2 2 8による腫瘍細胞の増殖抑制が認められず、FK 2 2 8では腫瘍への抑制効果が得られないタイプの腫瘍細胞をいい、例えば、後述する実施例からも示されるように腎臓癌細胞ACHNが挙げられる。また、他に腎臓癌細胞であるA 4 9 8もFK 2 2 8抵抗性腫瘍細胞の1種である。

かかる腫瘍細胞のFK 2 2 8での処理については、上記した「試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程」と同様な手順で行うことができる。

②上記工程①の処理によってその発現が増加、あるいは減少する遺伝子を選択する工程

当該遺伝子を選択する工程も、本明細書中に記載される各技術ならびに当分野で通常実施される方法を用いて行うことができる。好ましくは、一度に大量の遺伝子の発現状況が解析できるという利点から遺伝子チップを用いた技術を用いる。

③上記工程②で選択された遺伝子について、さらに

(i) FK 2 2 8での処理によりその発現が増加し、且つFK 2 2 8感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、

(i i) FK 2 2 8での処理によりその発現が増加し、且つFK 2 2 8感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子、

(i i i) FK 2 2 8での処理によりその発現が減少し、且つFK 2 2 8感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは

(i v) FK 2 2 8での処理によりその発現が減少し、且つFK 2 2 8感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子

を選択する工程

すなわち当該工程は、FK228で処理することによりその発現に増加、あるいは減少の何らかの変化を生じ、且つFK228に感受性であるか否かでその発現状況が異なる遺伝子を選択する工程であって、かかる遺伝子（群）の発現状況5を解析することは、FK228を投与することなくFK228の薬効を予測する有力な手段となり得る。

遺伝子の発現の増減を調べる方法も当分野で通常実施される方法を用いて行うことができ、本明細書中にも記載される各技術を用いて行う。好ましくは、一度に大量の遺伝子の発現状況が解析できるという利点から遺伝子チップを用いた技10術を用いる。

実施例

以下、本発明を実施例にて具体的且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

実施例1

15 (1) 薬剤調製

FR901228を必要量計り、溶媒(10%HC0-60/saline)を加え、超音波をかけ溶解する。陽性対照物質パクリタキセル(Paclitaxel)は、試験に先立って24mg/mLとなるようCremophor EL/ethanol(1:1)液に溶解し、冷蔵保存した。用時、9倍量の生理食塩水を加えて希釈し2.4mg/mL(溶媒成分:5%20 Cremophor EL-5%ethanol-90% saline)とした。

(2) 実験動物

薬剤の抗腫瘍試験には、日本チャールスリバーよりBALB/cANNCrj-nu/nuマウス(雄、6週齢)を購入し、一週間以上の馴化飼育の後、実験に用いた。マウスはSPF環境下飼育し、水と餌を自由に摂取させた。

25 (3) 実験腫瘍

ヒト培養前立腺癌細胞株(PC-3:財団法人癌研究会癌化学療法センター基礎部より入手)を $2 \sim 3 \times 10^7$ 個、ヌードマウス皮下に移植し、増殖した固形

腫瘍を3代以上継代後、実験に用いた。

(4) 実験移植および群分け

ヌードマウスで継代した固形腫瘍を、約3 mm角の腫瘍組織片としてマウスの右背部皮下に移植した。腫瘍移植後、腫瘍体積 ($1/2 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$) が10
5 0 ~ 3 0 0 mm³に達した時点で、1群を6匹に、腫瘍のばらつきが無くなるように群分けした。

(5) 投与

投与は群分け当日 (Day 0) に開始した。FR 9 0 1 2 2 8 投与群には4日
毎に3回 (q 4 d × 3)、FR 9 0 1 2 2 8 を静脈内投与した (3. 2 および1.
10 8 mg / k g)。陽性対照物質パクリタキセル投与群は5日間連続 (q d × 5)
でパクリタキセルを静脈内投与した (2 4 mg / k g)。対照群には、溶媒
(10% HCO-60 / saline) のみを投与した (q 4 d × 3)。各投与液量は0. 1 mL
/ 1 0 g 体重を投与日に測定した体重をもとに算出した。なお、FR 9 0 1 2 2
8 の 3. 2 mg / k g / d a y (q 4 d × 3) およびパクリタキセルの 2 4 mg
15 / k g / d a y (q d × 5) はそれぞれの最大許容摂取量 (MTD; Maximum
tolerated dose) である。

(6) 腫瘍サイズおよび体重の測定

腫瘍サイズ (長径、短径) および体重をDay 0 より週2回測定した。

(7) 抗腫瘍効果の評価

20 腫瘍の増殖程度は腫瘍増殖率 (Relative Tumor Volume) により評価した。増
殖抑制率は、Day 0 における腫瘍体積を1としたときの、それ以後の腫瘍体積
の相対的割合で表した。抗腫瘍効果の判定は薬剤の投与開始から14日目 (Day
y 1 4) について行い、対照群 (溶媒投与) の腫瘍増殖率に対する薬剤投与群の
比 (T/C%) が50%以下であり、かつ、Mann Whitney U-test で有意差
25 (P<0.01) がある場合を有効とした。

結果を図1に示す。FR 9 0 1 2 2 8 はインビボにおいて、ヒト前立腺癌に対
する抗腫瘍効果を示した。

実施例 2

(1) 薬剤調製

FR901228を必要量計り、溶媒 (10% $\text{HCO}-60/\text{saline}$) を加え、超音波をかけ溶解する。

5 (2) 実験動物

薬剤の抗腫瘍試験には、日本クレアより Fox Chase C.B-17/Icr-SCID. Jcl マウス (雄、6 週齢) を購入し、一週間以上の馴化飼育の後、実験に用いた。マウスは SPF 環境下飼育し、水と餌を自由に摂取させた。

(3) 実験腫瘍

- 10 ヒト培養リンパ腫細胞株 (U937: 蓑和田先生、林原生物化学研究所より入手) を RPMI (10% FCS 含有) で培養し、インビトロで継代した。

(4) 実験移植および群分け

- マウスにシクロホスファミド (塩野義製薬) を $150\text{mg}/\text{kg}$ を腹腔内に投与した。翌日インビトロで継代したリンパ腫をマウスの腹腔内に 1×10^7 個移植した。腫瘍移植翌日、1 群を 6 匹 (コントロール群 12 匹) に、体重のばらつきがなくなるように群分けした。
- 15

(5) 投与

- 投与は群分け当日 (Day 0) に開始した。FR901228 投与群には週 1 または 2 回、FR901228 を腹腔内に投与した ($0.1 \sim 1.0\text{mg}/\text{kg}$)。対照群には、溶媒 (10% $\text{HCO}-60/\text{saline}$) のみを投与した。
- 20

(6) 評価

抗腫瘍効果として、マウスの生存日数を測定した。

- 結果を図 2 に示す。図 2 (a) は、FR901228 を週 1 で、図 2 (b) は FR901228 を週 2 で投与した場合の結果である。FR901228 はインビトロにおいて、ヒトリンパ腫に対する抗腫瘍効果を示した。
- 25

実施例 3

(1) 薬剤調製

FR901228を必要量計り、溶媒（10% $\text{HCO}-60/\text{saline}$ ）を加え、超音波をかけ溶解する。陽性対照物質パクリタキセルは、試験に先立って 24 mg/mL となるようCremophor EL/ethanol(1:1)液に溶解し、冷蔵保存した。用時、9倍量の生理食塩水を加えて希釈し 2.4 mg/mL （溶媒成分：5% $\text{Cremophor EL}-5\%$ ethanol-90% saline ）とした。

（2）実験動物

薬剤の抗腫瘍試験には、日本チャールスリバーよりBALB/cANNCrj-nu/nuマウス（雄、6週齢）を購入し、一週間以上の馴化飼育の後、実験に用いた。マウスはSPF環境下飼育し、水と餌を自由に摂取させた。

10 （3）実験腫瘍

ヒト培養腎臓癌細胞株1系（ACHN：ATCCより入手）、ヒト培養前立腺癌細胞株1系（PC-3：ATCCより入手）を $2\sim 3\times 10^7$ 個ヌードマウス皮下に移植し、増殖した固形腫瘍を3代以上継代後、実験に用いた。

（4）実験移植および群分け

15 ヌードマウスで継代した固形腫瘍を、約3mm角の腫瘍組織片としてマウスの右背部皮下に移植した。腫瘍移植後、腫瘍体積（ $1/2\times \text{長径}\times \text{短径}^2$ ）が $1.00\sim 300\text{ mm}^3$ に達した時点で、1群を6匹に、腫瘍のばらつきが無くなるように群分けした。

（5）投与

20 投与は群分け当日（Day 0）に開始した。FR901228投与群には4日毎に3回（ $q4d\times 3$ ）、FR901228を静脈内投与した（ 3.2 および 1.8 mg/kg ）。陽性対照物質パクリタキセル投与群は5日間連続（ $qd\times 5$ ）でパクリタキセルを静脈内投与した（ 24 mg/kg ）。対照群には、溶媒（10% $\text{HCO}-60/\text{saline}$ ）のみを投与した（ $q4d\times 3$ ）。各投与液量は0.1mL/10g体重を投与日に測定した体重をもとに算出した。なお、FR901228の 3.2 mg/kg/day （ $q4d\times 3$ ）およびパクリタキセルの 24 mg/kg/day （ $qd\times 5$ ）はそれぞれのMTD量である。

(6) 腫瘍サイズおよび体重の測定

腫瘍サイズ（長径、短径）および体重をDay 0より週2回測定した。

(7) 抗腫瘍効果の評価

- 腫瘍の増殖程度は腫瘍増殖率 (Relative Tumor Volume) により評価した。増殖抑制率は、Day 0における腫瘍体積を1としたときの、それ以後の腫瘍体積の相対的割合で表した。抗腫瘍効果の判定は薬剤の投与開始から14日目 (Day 14) について行い、対照群（溶媒投与）の腫瘍増殖率に対する薬剤投与群の比 (T/C%) が50%以下であり、かつ、Mann Whitney U-test で有意差 (P<0.01) がある場合を有効とした。

- 10 結果を図3に示す。FR901228は3.2 mg/kgの投与量でPC-3に強い抗腫瘍作用を示した (図3 (a)) が、ACHN (図3 (b)) に対して抗腫瘍作用を示さなかった。

実施例4

(1) 薬剤調製

- 15 FR901228を必要量計り、溶媒（9.9: 5%エタノール）で1 mg/mLの濃度に溶解した。その後、培養液で希釈した。

(2) 実験腫瘍

ヒト培養癌細胞 (PC-3およびACHN) はDMEM(10%FCS含有)中で培養した。

- 20 (3) 培養およびRNA抽出

細胞を培養皿あたり 2×10^6 個播種し、FR901228 (5 ng/mL) 存在下で所定時間培養した。培養後、TRIZOL reagent (GIBCO BRL) を用い、操作説明書に従いRNAを抽出した。

(4) リアルタイムPCR

- 25 RNAはTaq-man reverse transcription reagent (PE Biosystem) を用い操作説明書に従い逆転写した。その後、p21遺伝子はSYBR green PCR master mix (PE Biosystem) および primer 5'-GGC AGA CCA GCA TGA CAC ATT-3' (p21

upstream) (配列表配列番号 1)、5'-GGA TTA GGG CTT CCT CTT GGA G-3' (配列表配列番号 2) を用い操作説明書に従い増幅し、ABI 7700 PRISM sequence detector (PE Biosystem) で検出した。p 2 1 遺伝子の発現量は、標準曲線より算出し、さらに β -actin 遺伝子を内部標準として、 β -actin 遺伝子発現量で除して標準化した相対発現量として表した。

結果を図 4 に示す。インビトロで FR 9 0 1 2 2 8 を接触させることにより経時的に PC-3 (図 4 (a)) の p 2 1 遺伝子発現上昇が見られた。一方 ACHN では p 2 1 遺伝子の発現上昇が見られなかった (図 4 (b))。また、無処置時において、PC-3 においては p 2 1 遺伝子はほとんど発現していないが、ACHN においては p 2 1 遺伝子の発現が見られた (図 4 (c))。

実施例 5

ヌードマウスの皮下にヒト前立腺癌 PC-3 または腎臓癌 ACHN を移植し腫瘍の大きさが 100 ~ 300 mg に達した時点で FR 9 0 1 2 2 8 3.2 mg / kg を静脈内に投与した。経時的に腫瘍を摘出し、RNA を抽出後実施例 4 と同様、リアルタイム PCR で p 2 1 遺伝子および c-myc 遺伝子の発現量を調べた。尚、c-myc 遺伝子は SYBR green PCR master mix (PE Biosystem) および primer 5'-GAC AGA TCA GCA ACA ACC GAA A-3' (human c-myc upstream) (配列表配列番号 3)、5'-TTG TGT GTT CGC CTC TTG ACA T-3' (human c-myc downstream) (配列表配列番号 4) を用い操作説明書に従い増幅し、ABI 7700 PRISM sequence detector (PE Biosystem) で検出した。

結果を図 5 に示す。インビボにおいて、PC-3 は FR 9 0 1 2 2 8 投与後 3 時間後をピークに p 2 1 遺伝子の発現上昇が見られた (図 5 (a))。一方 ACHN では p 2 1 遺伝子の発現上昇がみられなかった (図 5 (a))。c-myc 遺伝子は PC-3 で発現の低下が見られたが、ACHN では発現の上昇が見られた (図 5 (b))。

実施例 6 : 遺伝子チップによる FK 2 2 8 の腫瘍細胞における遺伝子発現解析 (インビトロ)

FK228のヒト腫瘍細胞におけるインビトロでの遺伝子発現に及ぼす効果を、遺伝子チップを用い解析した。

〈材料・手順〉

(1) 実験材料

5 薬剤 FK228 (FR901228)

使用濃度: 50 ng/mL

調製方法: 予めエタノールで10 mg/mL溶液を調製しておき、これを培養液で段階的に希釈して50 ng/mL溶液を調製した。

10 剤形: 溶液 (用時調製)

使用細胞 ヒト前立腺癌 (PC-3)、ヒトリンパ腫 (U937)、ヒト腎臓癌 (ACHN)

培養液 DMEM (PC-3、ACHN用)、RPMI 1640 (U937用)

いずれも日研生物医学研究所より入手。さらに、FCS (Moregate)

15 Penicillin-Streptomycin (ICN Biomedicals Inc.) を含有する。

RNA抽出 RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen)

RNase, DNase free water (Life Technologies)

DNA合成 Superscript Choice System (Life Technologies)

エタチンメイト (ニッポンジーン)

20 T7-(dT)24 Primer (Amersham Pharmacia)

cRNA合成 BioArray RNA Transcript Labeling Kit (Amersham Pharmacia)

cRNA断片化 Trizma Base (SIGMA)

氷酢酸 (SIGMA)

酢酸マグネシウム (SIGMA)

25 酢酸カリウム (SIGMA)

ハイブリダイゼーション Eukaryotic Hybridization Control Kit (Amersham Pharmacia)

0.5M EDTA solution (SIGMA)

MES Sodium Salt (SIGMA)

MES Free Acid Monohydrate (SIGMA)

Herring Sperm DNA (Promega)

- 5 Acetylated Bovine Serum Albumin Soln. (Life Technologies)

染色 Phycoerythrin-Streptavidin (Molecular Probes)

Goat IgG, Reagent Grade (SIGMA)

Anti-streptavidin ab (goat), biotinylated (Vector Lab)

- 10 使用 chip HuGene FL アレイ (Amersham Pharmacia)

(2) 細胞調製とRNA抽出

- F 7 5 フラスコでコンフルエントになったヒト腫瘍細胞 (PC-3、U937、ACHN) をトリプシン処理により単一細胞の懸濁液にし、F 7 5 フラスコ 5 本に播種し 24 時間培養した。培養液を捨てて、新鮮な培養液 18 mL および 10 15 倍濃度 (50 ng/mL) の FR 9 0 1 2 2 8 溶液 2 mL を加え、所定時間 (0、1、3、12 および 24 時間) 37 °C の CO₂ インキュベーターで培養した。培養終了後、培養液を捨てて RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen) のプロトコルに従って全 RNA を抽出した。RNA を定量し、電気泳動で確認した。

(3) cRNA の合成

- 20 GeneChip マニュアルの第 2 章～第 4 章、RNeasy Mini Kit および RNA Transcript Labeling Kit のマニュアルに従い、RNA の精製、cDNA の合成、cRNA の合成、cRNA の断片化を行った。

(4) ハイブリダイゼーション、洗浄-染色、スキャンニング

- ハイブリダイゼーション、洗浄-染色、スキャンニングは GeneChip マニュアルの第 5 章～第 7 章に従って行った。

(5) 解析

GeneSpring (マイクロアレイデータ解析ソフト: Silicon Genetics 社製) を

用いて解析を行った。

〈結果〉

FK228感受性腫瘍細胞であるヒト前立腺癌PC-3およびヒトリンパ腫U937、ならびにFK228抵抗性腫瘍細胞であるヒト腎臓癌ACHNをインビトロにおいてFK228に経時的に接触させ、その後RNAを抽出し、GeneChipを用いて検索可能な7070遺伝子についてFK228によって発現が変化する遺伝子を調べた。これらの遺伝子について以下の手順に従った解析を行った。

解析1：ヒストンデアセチラーゼ阻害によって発現が変化する遺伝子の選択

FK228によって発現が変化する遺伝子の絞込みの条件として発現が直線的に変化する遺伝子を選択した (GeneSpringの解析条件：全ての時間で0.5倍以上または0.5倍以下、その発現が変化する遺伝子)。

解析2：薬効に関与する遺伝子の選択

FK228と72時間接触させた場合のPC-3、U937およびACHNに対する増殖抑制効果は IC_{50} 値でそれぞれ3.17、3.20および4.25 ng/mLで、これらの腫瘍細胞に対してほぼ同程度の増殖抑制効果を示した。当該結果から増殖抑制に関する遺伝子は全ての細胞で共通に発現が変化することが考えられた。これら3種類のヒト腫瘍細胞で共通して発現が上昇する遺伝子を105遺伝子、共通して減少する遺伝子を100遺伝子見出した。

実施例7：遺伝子チップによるFK228の腫瘍細胞における遺伝子発現解析

20 (インビボ)

FK228のヒト腫瘍細胞におけるインビボでの遺伝子発現に及ぼす効果を、遺伝子チップを用い解析した。

〈材料・手順〉

(1) 実験材料

25 薬剤 FK228 (FR901228)

投与量：10 mg/kg

投与容量：10 mL/kg

溶媒：10% HCO-60/saline 溶液

剤形：溶液（用時調製）

腫瘍細胞 ヒト前立腺癌 PC-3（腫瘍片 3mm×3mm×3mm/マウス
移植部位 s.c.）

5 ヒト胃癌 SC-6；財団法人実験動物中央研究所より入手（腫瘍片
3mm×3mm×3mm/マウス 移植部位 s.c.）

ヒト腎臓癌 ACHN（腫瘍片 3mm×3mm×3mm/マウス 移
植部位 s.c.）

ヒト腎臓癌 A498；ATCCより入手（腫瘍片 3mm×3mm×
10 3mm/マウス 移植部位 s.c.）

継代動物 雄性 BALB c/ nu/nu

RNA抽出 RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen)

RNase, DNase free water (Life Technologies)

DNA合成 Superscript Choice System (Life Technologies)

15 エタチンメイト（ニッポンジーン）

T7-(dT)24 Primer (Amersham Pharmacia)

cRNA合成 BioArray RNA Transcript Labeling Kit (Amersham Pharmacia)

cRNA断片化 Trizma Base (SIGMA)

氷酢酸 (SIGMA)

20 酢酸マグネシウム (SIGMA)

酢酸カリウム (SIGMA)

ハイブリダイゼーション Eukaryotic Hybridization Control Kit (Amersham
Pharmacia)

0.5M EDTA solution (SIGMA)

25 MES Sodium Salt (SIGMA)

MES Free Acid Monohydrate (SIGMA)

Herring Sperm DNA (Promega)

Acetylated Bovine Serum Albumin Soln. (Life
Technologies)

使用 chip HuGene FL アレイ (Amersham Pharmacia)

(2) 細胞調製とRNA抽出

- 5 ヌードマウスの皮下に3mm角の腫瘍片(PC-3、SC-6、ACHN、A
498)を移植し、腫瘍の大きさがおよそ100mg(長径9mm、短径8mm)
になった時点でFR901228 10mg/kgを静脈内に投与した。FR
901228投与後0、0.5、1、2および4時間後に腫瘍を摘出し、
RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen)のプロトコルに従って全RNAを抽出した。R
10 NAを定量し、電気泳動で確認した。

(3) cRNAの合成

GeneChip マニュアルの第2章～第4章、RNeasy Mini Kit およびRNA
Transcript Labeling Kit のマニュアルに従い、RNAの精製、cDNAの合成、
cRNAの合成、cRNAの断片化を行った。

- 15 (4) ハイブリダイゼーション、洗浄-染色、スキャンニング

ハイブリダイゼーション、洗浄-染色、スキャンニングはGeneChip マニュアル
の第5章～第7章に従って行った。

(5) 解析

- GeneSpring (マイクロアレイデータ解析ソフト: Silicon Genetics 社製) を
20 用いて解析を行った。

〈結果〉

- ヒト前立腺癌PC-3、ヒト胃癌SC-6、ヒト腎臓癌ACHNおよびヒト腎
臓癌A498担癌マウスにFR901228 10mg/kgを静脈内投与し経
時的(0、0.5、1、2および4時間)に腫瘍を摘出し、その後RNAを抽出
25 しGeneChipを用いて検索可能な7070遺伝子についてFR901228によ
って発現が変化する遺伝子を調べた。

ヒト前立腺癌PC-3、ヒト胃癌SC-6、ヒト腎臓癌ACHNおよびヒト腎

臓癌A498の、FR901228 3. 2mg/kgを投与した際の増殖抑制率はそれぞれ98%、84%、20%および29%であることから、PC-3およびSC-6をFK228感受性腫瘍、ACHNおよびA498をFK228抵抗性腫瘍とした。

5 実施例8：FK228感受性腫瘍ならびにFK228抵抗性腫瘍における遺伝子発現様式

実施例7でその感受性あるいは抵抗性が確認された腫瘍における遺伝子発現様式とFK228の薬効との相関関係を調べた。実施例6のインビトロ試験において判明したFK228処理によりその発現が上昇する遺伝子（105個）と発現10 が減少する遺伝子（100個）に注目し、それらの遺伝子と薬効に相関があるか検討した。さらに感受性腫瘍で発現が高く抵抗性腫瘍で発現が低い、または感受性腫瘍で発現が低く抵抗性腫瘍で発現の高い遺伝子があるかを調べた。その結果、インビトロでFR901228処理により発現が上昇する105個の遺伝子のうち、感受性腫瘍で発現が高く抵抗性腫瘍で発現が低い遺伝子が6個、感受性腫瘍15 で発現が低く抵抗性腫瘍で発現の高い遺伝子を4個見出した（表1）。また、インビトロでFR901228処理により発現が減少する100個の遺伝子のうち、感受性腫瘍で発現が高く抵抗性腫瘍で発現が低い遺伝子が4個、感受性腫瘍で発現が低く抵抗性腫瘍で発現の高い遺伝子を9個見出した（表2）。

表1：感受性腫瘍 (Sensitive Tumor) で発現が高く抵抗性腫瘍 (Resistant Tumor) で発現が低い遺伝子または感受性腫瘍 (Sensitive Tumor) で発現が低く抵抗性腫瘍 (Resistant Tumor) で発現の高い遺伝子 (インビトロでFR9012528処理により発現が上昇する遺伝子)

Sensitive Tumor (High) and Resistant Tumor (Low)

M13686_s_at (SFTPI) pulmonary surfactant-associated protein

U68111_at (PPP1R2) Source: Human protein phosphatase inhibitor 2 (PPP1R2) gene, exon 6 and complete cds.

U60521_at (CASP9) caspase 9, apoptosis-related cysteine protease

L19783_at (PIGH) phosphatidylinositol glycan, class H

X60487_at (H4/h)

J04056_at (CBR1) carbonyl reductase 1

Sensitive Tumor (Low) and Resistant Tumor (High)

U56998_at (CNK) cytokine-inducible kinase

X68277_at (DUSP1) dual specificity phosphatase 1

U65092_at (MSG1) melanocyte specific gene 1

X01703_at Source: Human gene for alpha-tubulin (b alpha 1).

表 2 : 感受性腫瘍 (Sensitive Tumor) で発現が高く抵抗性腫瘍 (Resistant Tumor) で発現が低い遺伝子または感受性腫瘍 (Sensitive Tumor) で発現が低く抵抗性腫瘍 (Resistant Tumor) で発現の高い遺伝子 (インビトロで FR 9 0 1 2 5 2 8 処理により発現が減少する遺伝子)

Sensitive Tumor (High) and Resistant Tumor (Low)

X74987_s_at (RNASEL1) ribonuclease L (2',5'-oligoadenylate synthetase-dependent) inhibitor

J03801_f_at (LYZ) lysozyme (renal amyloidosis)

U09578_at (MAPKAPK3) mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3

D50678_at (LRP8) low density lipoprotein receptor-related protein 8

Sensitive Tumor (Low) and Resistant Tumor (High)

Y10375_s_at (SIRP-alpha1)

Z14982_ma1_at (MHC-encoded proteasome subunit gene LAMP7-E1) alternative splicing

X62048_at (WEE1) wee1+ (S. pombe) homolog

X71874_cds1_at (PSMB10) proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10

U32849_at (NMI) N-myc (and STAT) interactor

D55716_at (P1cdc47) Source: Human mRNA for P1cdc47, complete cds.

M98045_at (FPGS) folypolyglutamate synthase U21551_at (ECA39) Source: Human ECA39 mRNA, complete cds.

U06681_at

U07620_at (PRKM10) protein kinase mitogen-activated 10 (MAP kinase)

これらの遺伝子は、FK 2 2 8 の薬効との相関性、ならびに FK 2 2 8 への感受性あるいは抵抗性との相関性が示唆される遺伝子であり、これらの遺伝子が薬効予測マーカーとして利用できる可能性が示された。

産業上の利用分野

ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する FK 2 2 8 (特に FR 9 0 1 2 2 8) またはその塩を有効成分として含む、本発明の前立腺癌治療剤および悪性リ

ンパ腫治療剤はインビトロのみならずインビボにおいても優れた抗腫瘍作用を有する。したがって、臨床での使用、特に癌治療に好適に使用し得る。また、本発明の評価方法あるいはスクリーニング方法を使用することで、標的とする腫瘍細胞特異的に抗腫瘍効果を発揮することができるヒストンデアセチラーゼ阻害剤を、
5 実際に人体に投与することなく見出すことが可能となる。

配列表フリーテキスト

配列番号1 : p 2 1 mRNAのPCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

10 配列番号2 : p 2 1 mRNAのPCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号3 : c - m y c mRNAのPCR用プライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号4 : c - m y c mRNAのPCR用プライマーとして作用すべく設計
15 されたオリゴヌクレオチド。

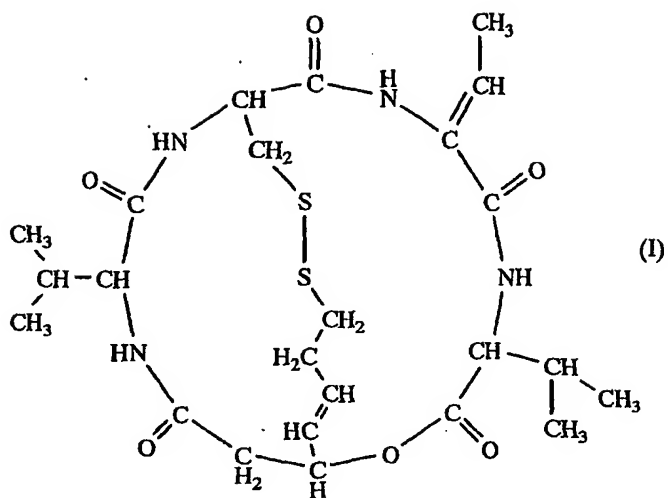
配列番号5 : X a a は式 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CHCH}_3)\text{COOH}$ で表されるアミノ酸である。

式 $\text{COOHCH}_2\text{CH}(\text{CHCHC}_2\text{H}_4\text{SH})\text{OH}$ のカルボキシル基が1番目のアミノ酸であるV a 1のアミノ基と結合し、水酸基が4番目のアミノ酸であるV a 1のカルボキシル基と結合し、SH基が2番目のアミノ酸であるC y sのSH基とジスルフィド結合している。
20

本出願は、日本で出願された特願2001-250846を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

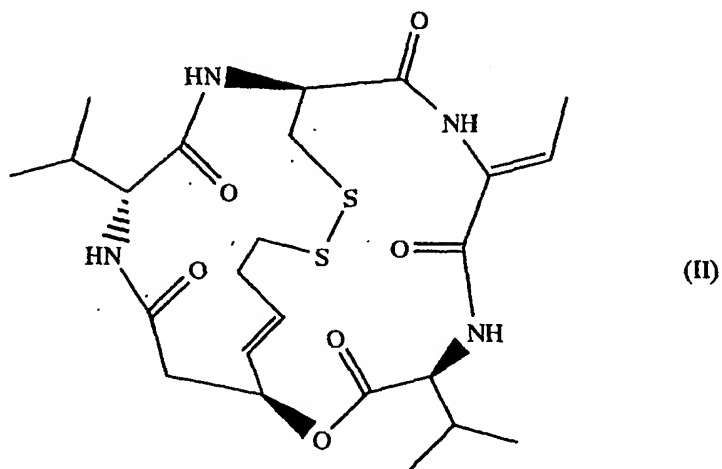
1. 式 (I)



で表される化合物またはその塩を有効成分として含有する前立腺癌治療剤。

5

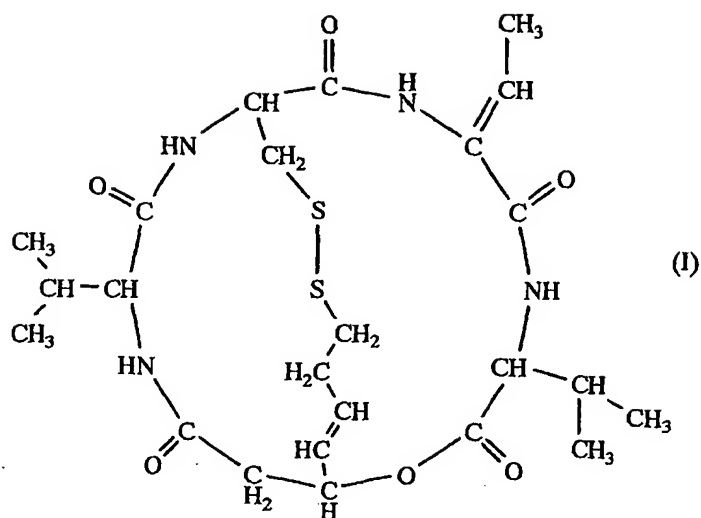
2. 式 (I) で表される化合物が、式 (I I)



で表される化合物である請求の範囲 1 に記載の前立腺癌治療剤。

10 3. インビボにおける抗腫瘍作用を有することを特徴とする、請求の範囲1に記載の前立腺癌治療剤。

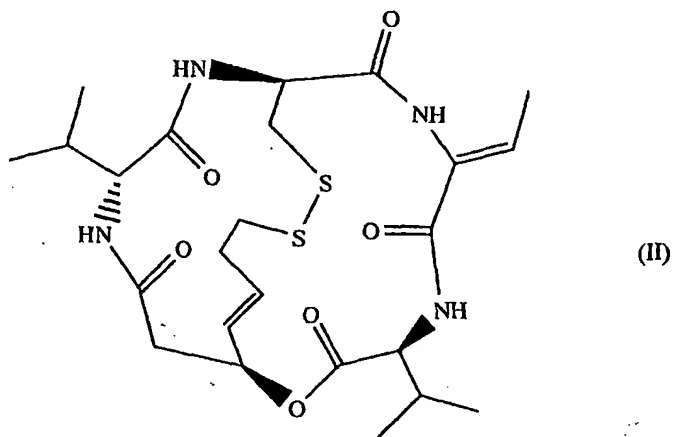
4. 式 (I)



で表される化合物またはその塩を有効成分として含有する T 細胞リンパ腫以外の

5 悪性リンパ腫治療剤。

5. 式 (I) で表される化合物が、式 (II)

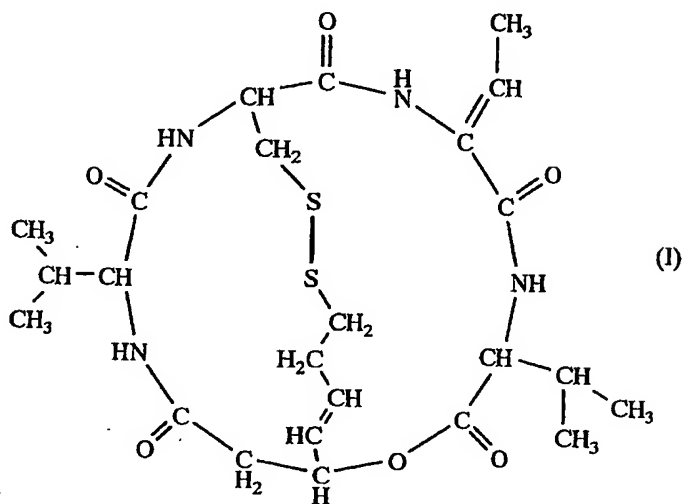


で表される化合物である請求の範囲 4 に記載の T 細胞リンパ腫以外の悪性リンパ

10 腫治療剤。

6. インビボにおける抗腫瘍作用を有することを特徴とする、請求の範囲 4 に記載の T 細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療剤。

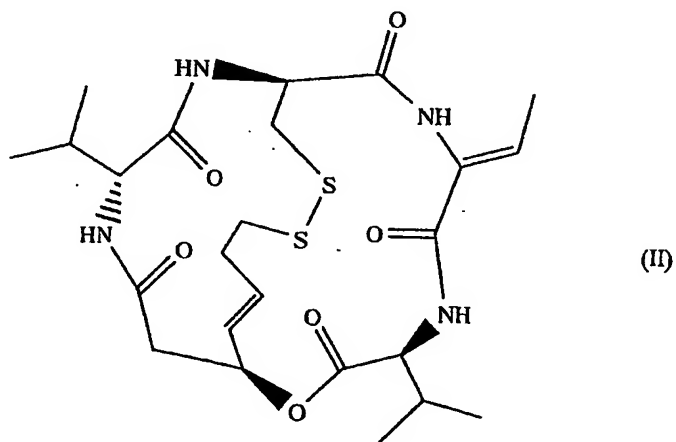
7. 式 (I)



5

で表される化合物またはその塩および製剤上許容される担体を含有する前立腺癌治療用医薬組成物。

8. 式 (I) で表される化合物が、式 (II)

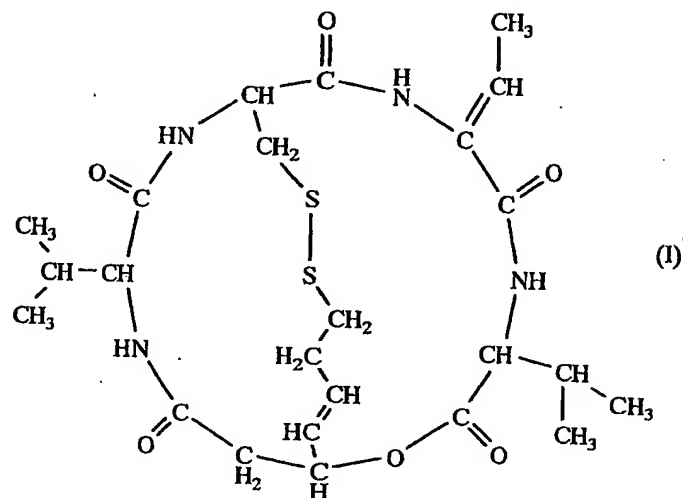


10

で表される化合物である請求の範囲 7 に記載の医薬組成物。

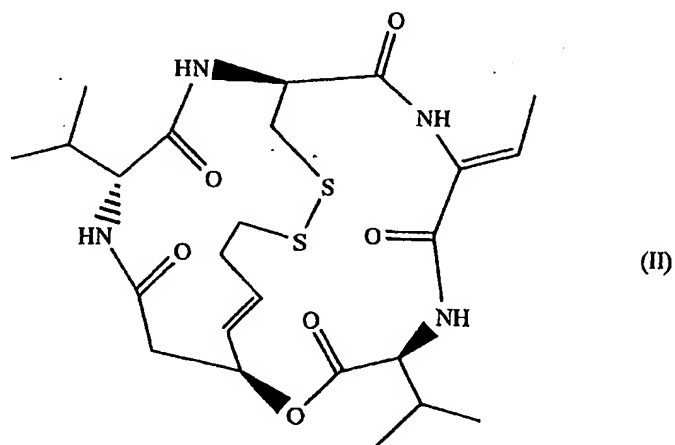
9. インビボにおける抗腫瘍作用を有することを特徴とする、請求の範囲 8 に記載の医薬組成物。

5 10. 式 (I)



で表される化合物またはその塩および製剤上許容される担体を含むT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療用医薬組成物。

10 11. 式 (I) で表される化合物が、式 (II)

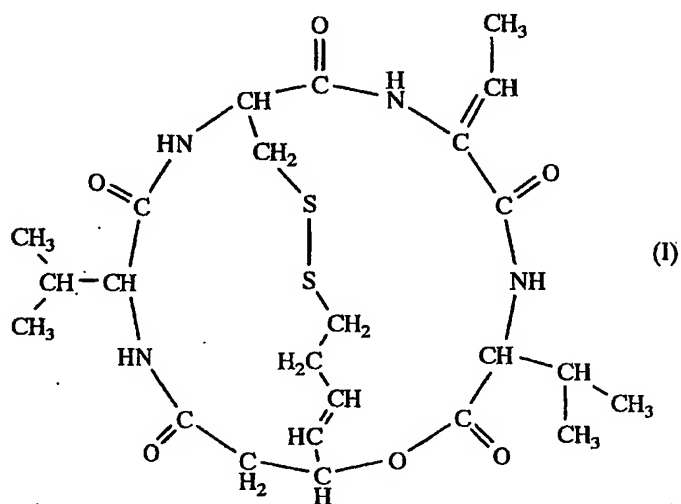


で表される化合物である請求の範囲 10 に記載の医薬組成物。

12. インビボにおける抗腫瘍作用を有することを特徴とする、請求の範囲 10 に記載の医薬組成物。

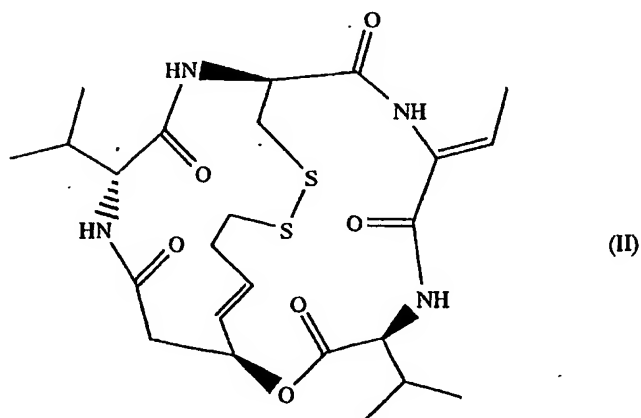
5

13. 有効量の式 (I)



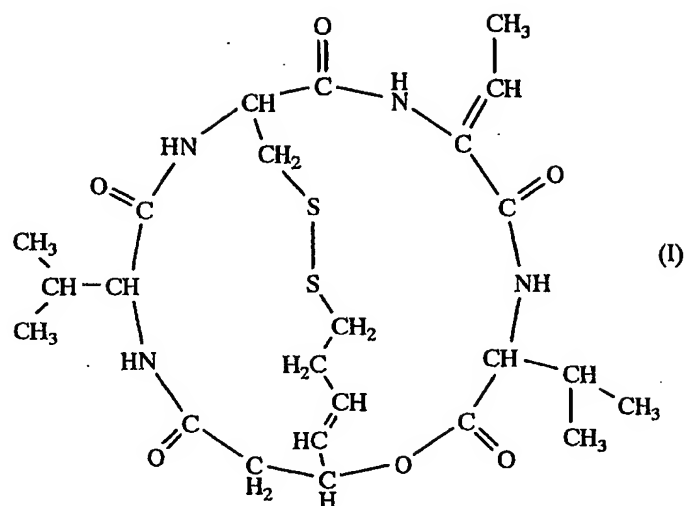
で表される化合物またはその塩を患者に投与することを含む前立腺癌の治療方法。

10 14. 式 (I) で表される化合物が、式 (II)



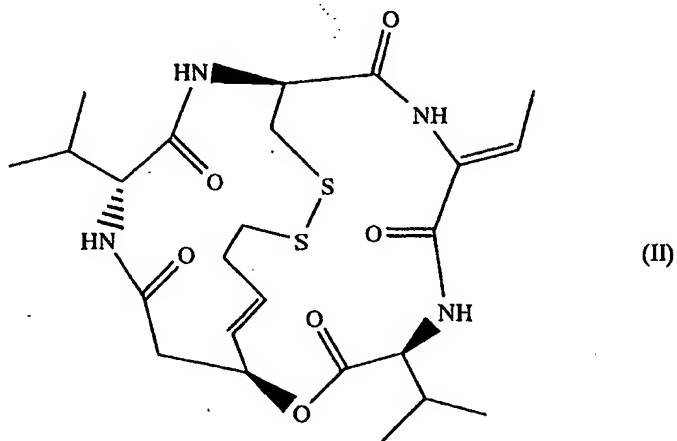
で表される化合物である請求の範囲 13 に記載の治療方法。

15. 有効量の式 (I)



で表される化合物またはその塩を患者に投与することを含む、T細胞リンパ腫以
5 外の悪性リンパ腫の治療方法。

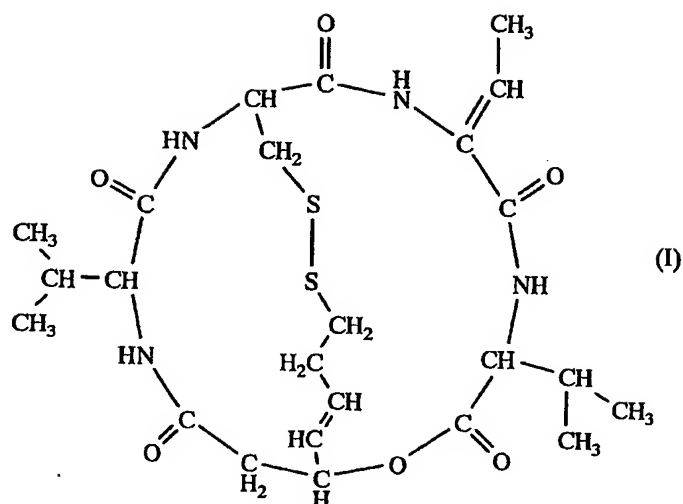
16. 式 (I) で表される化合物が、式 (II)



で表される化合物である請求の範囲 15 に記載の治療方法。

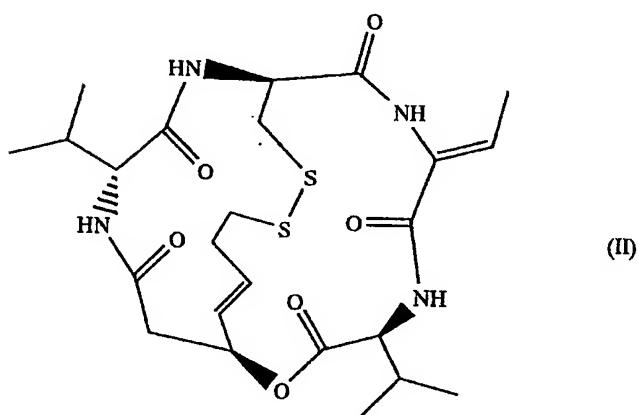
10

17. 前立腺癌治療剤を製造する為の、式 (I)



で表される化合物またはその塩の使用。

18. 式 (I) で表される化合物が、式 (II)



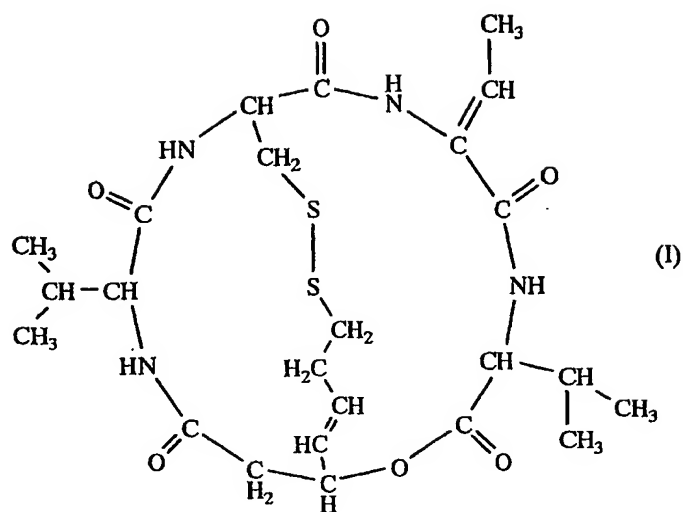
5

で表される化合物である請求の範囲 17 に記載の使用。

19. 前立腺癌治療剤がインビボで抗腫瘍作用を有するものである、請求の範囲 17 に記載の使用。

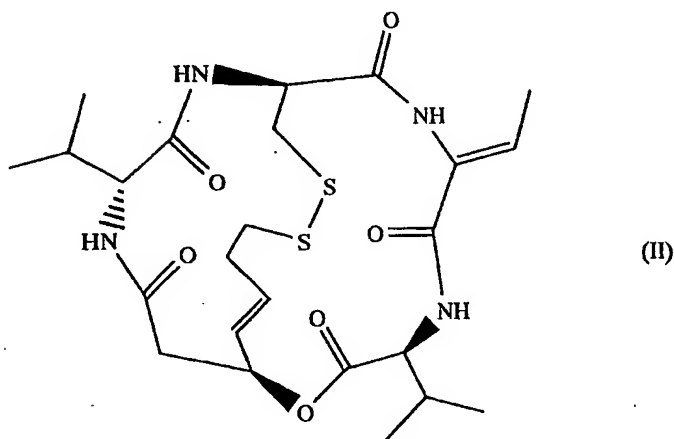
10

20. T細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫の治療剤の製造の為の式 (I)



で表される化合物またはその塩の使用。

21. 式 (I) で表される化合物が、式 (I I)



5

で表される化合物である請求の範囲 20 に記載の使用。

22. T細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療剤がインビボで抗腫瘍作用を有するものである、請求の範囲 20 に記載の使用。

10

23. 請求の範囲 7 に記載の前立腺癌治療用医薬組成物および当該医薬組成物を

前立腺癌の治療に使用し得るかまたは使用すべきであることを記載した書類を含む商業的パッケージ。

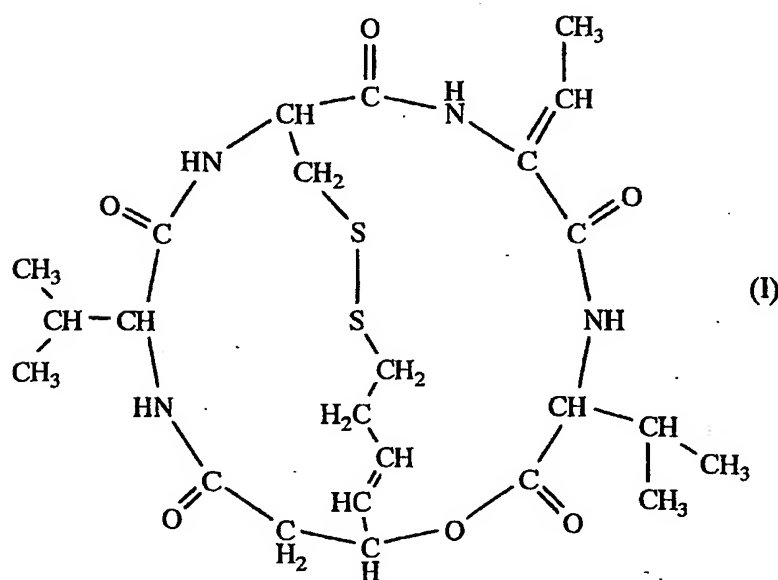
24. 請求の範囲10に記載のT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療用医薬組成物および当該医薬組成物をT細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫の治療に使用し得るかまたは使用すべきであることを記載した書類を含む商業的パッケージ。

25. 少なくとも、試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程と、該阻害剤の処理前ならびに処理後で該試験細胞における特定の遺伝子の発現変化を測定し、両者の発現量を比較する工程とを含むことを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法。

26. 特定の遺伝子がp21遺伝子および/またはc-myc遺伝子である、請求の範囲25に記載の抗腫瘍効果の評価方法。

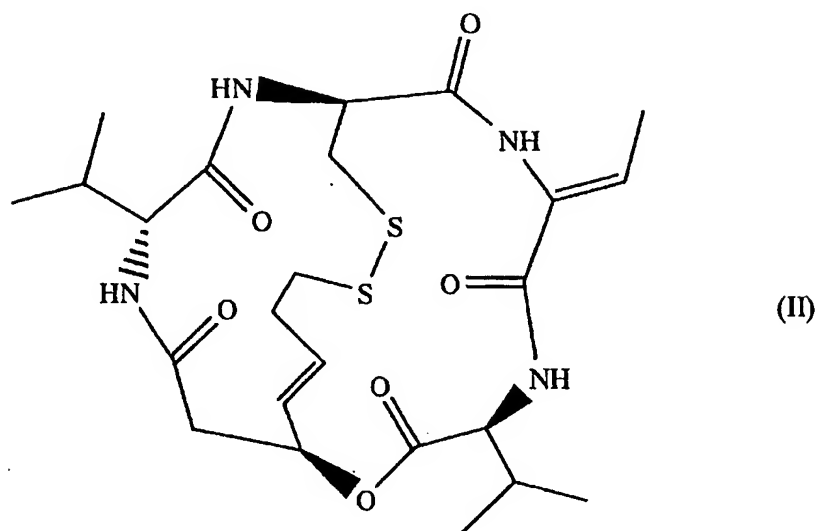
15

27. ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が式(I)



で表される化合物またはその塩である、請求の範囲 25 または 26 に記載の抗腫瘍効果の評価方法。

28. ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が式 (I I)



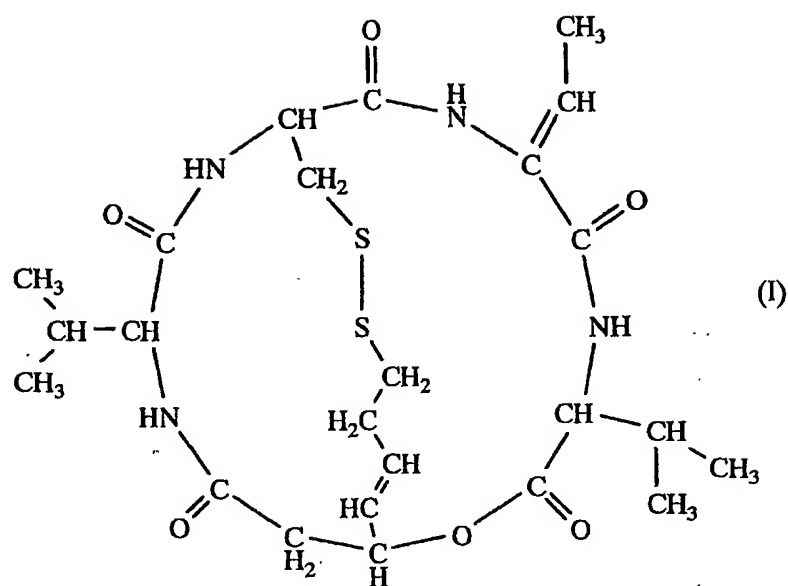
5

で表される化合物またはその塩である、請求の範囲 27 に記載の抗腫瘍効果の評価方法。

29. 少なくとも、試験細胞をヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程と
 10 該阻害剤の処理前ならびに処理後で該試験細胞における特定の蛋白質の発現変化
 を測定し、両者の発現量を比較する工程とを含むことを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法。

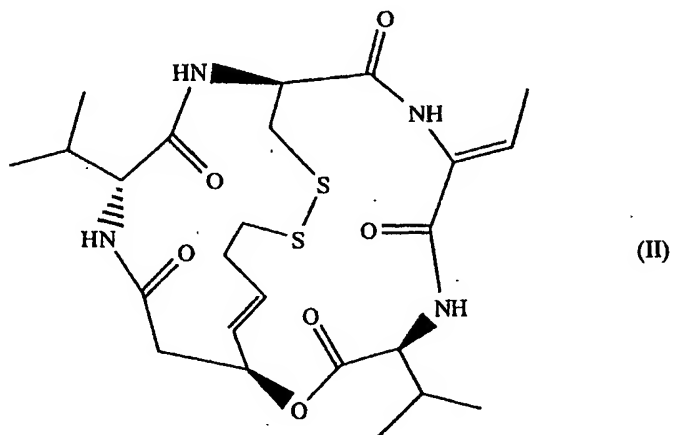
30. 特定の蛋白質が p 21 および/または c-myc である、請求の範囲 29
 15 に記載の抗腫瘍効果の評価方法。

31. ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が式 (I)



で表される化合物またはその塩である、請求の範囲 29 または 30 に記載の抗腫瘍効果の評価方法。

5 3 2. ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が式 (I I)



で表される化合物またはその塩である、請求の範囲 31 に記載の抗腫瘍効果の評価方法。

33. 請求の範囲25～32のいずれかに記載の抗腫瘍効果の評価方法を用いることを特徴とする、部位特異的な抗腫瘍活性を有するヒストンデアセチラーゼ阻害剤のスクリーニング方法。

5 34. FK228の薬効予測の指標となり得る遺伝子を得る方法であって、少なくとも、

①FK228感受性腫瘍細胞およびFK228抵抗性腫瘍細胞をFK228で処理する工程、

②上記工程①で発現が増加、あるいは減少する遺伝子を選択する工程、

10 ③上記工程②で選択された遺伝子について、さらに

(i) FK228での処理によりその発現が増加し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、

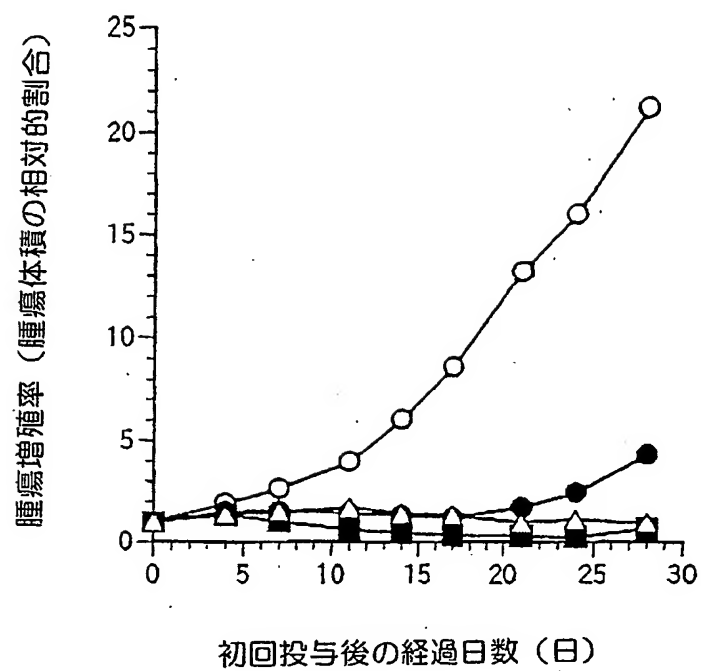
(ii) FK228での処理によりその発現が増加し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子、

15 (iii) FK228での処理によりその発現が減少し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは

(iv) FK228での処理によりその発現が減少し、且つFK228感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子を選択する工程を含む方法。

20

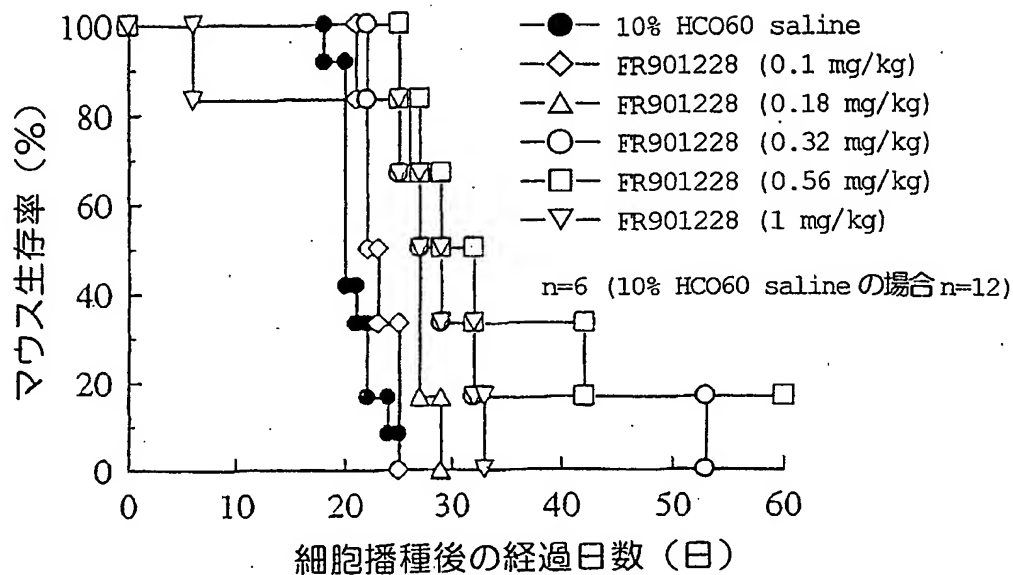
図 1



—○— コントロール
—●— FR901228 (1.8 mg/kg)
—■— FR901228 (3.2 mg/kg)
—△— パクリタキセル (24 mg/kg)

図2

(a)



(b)

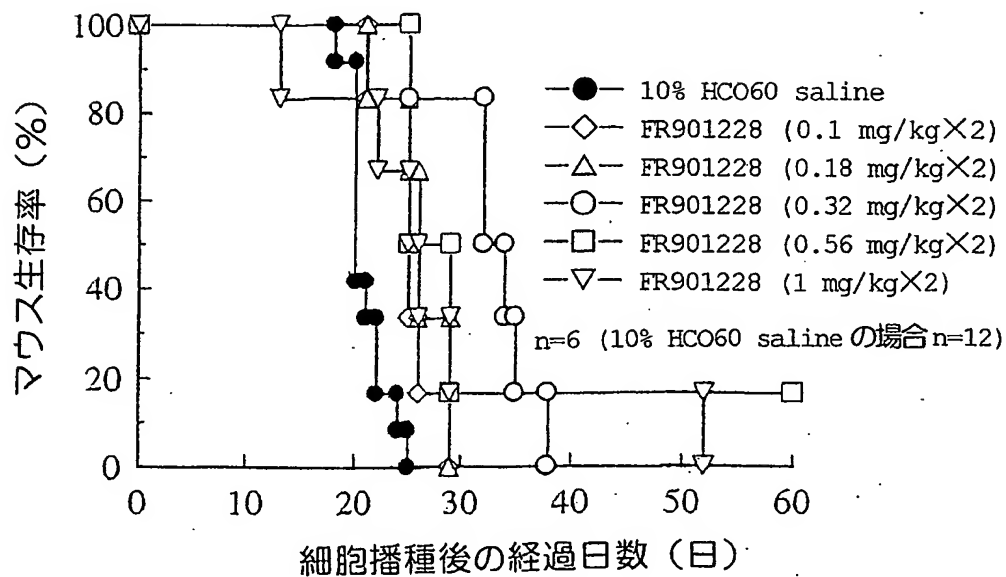
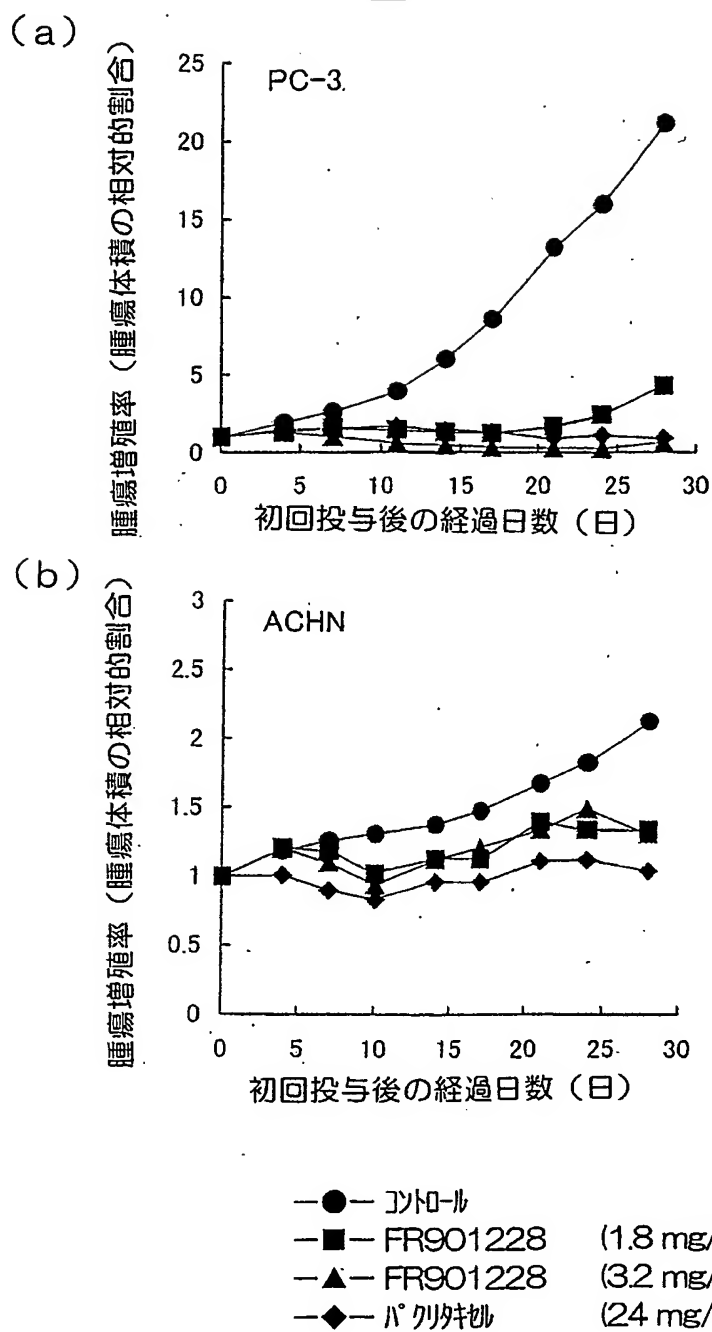
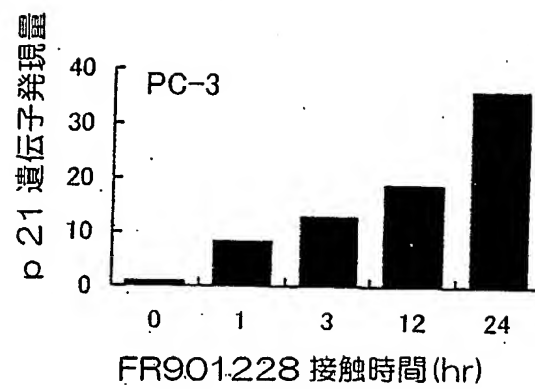


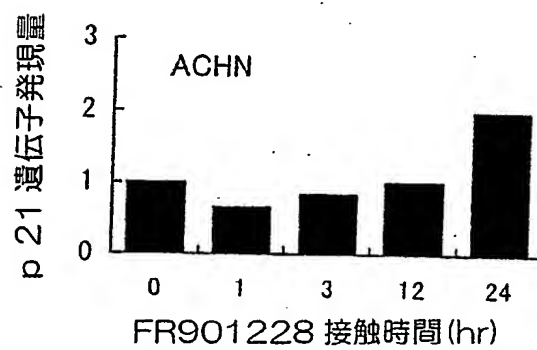
図3



(a) 図 4

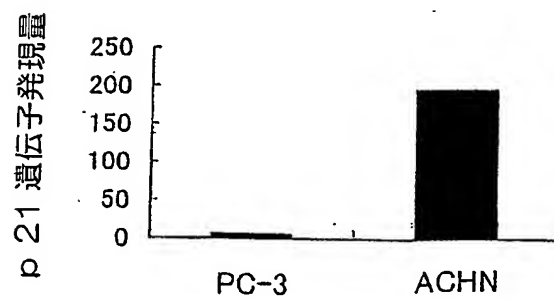


(b)

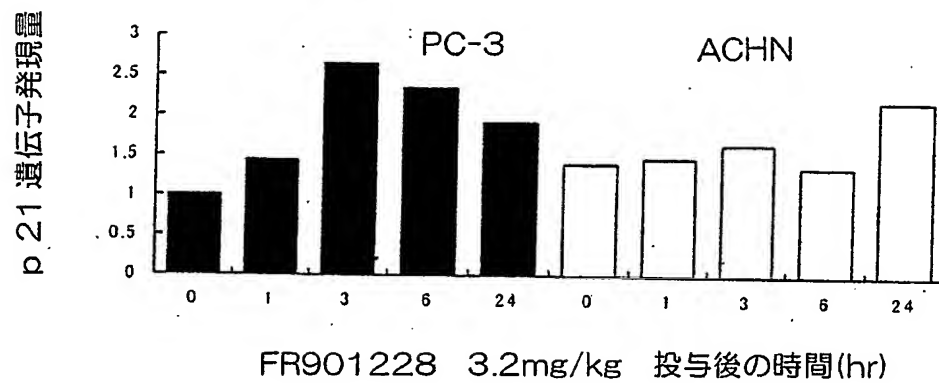


(c)

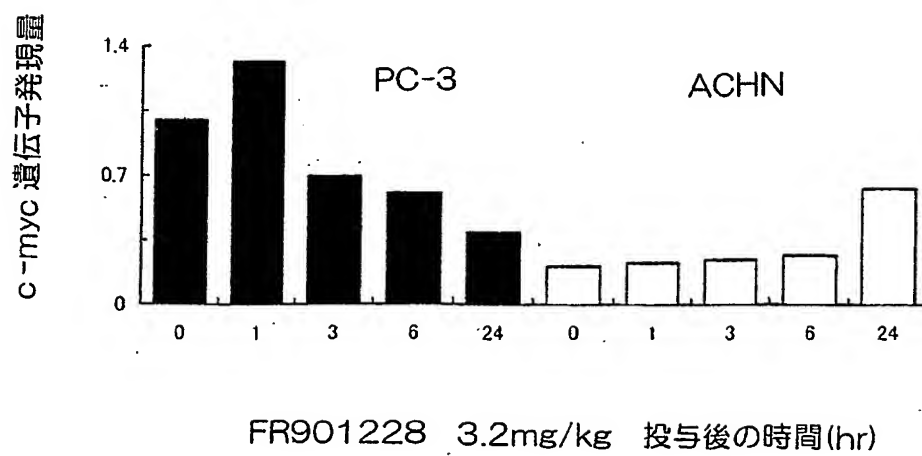
無処置時のp 21 遺伝子発現量



(a) 図5



(b)



SEQUENCE LISTING

<110> FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Pharmaceutical use of histone deacetylase inhibitor
and evaluation method of its antitumor effect

<130> 09491

<150> JP 2001-250846

<151> 2001-8-21

<160> 5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of
p21 mRNA.

<400> 1

ggcagaccag catgacacat t . 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of

p21 mRNA.

<400> 2

ggattagggc ttcctcttgg ag

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of c-myc mRNA.

<400> 3

gacagatcag caacaaccga aa

22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of c-myc mRNA.

<400> 4

ttgtgtgttc gcctcttgac at

22

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Chromobacterium sp.

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa is an amino acid represented by the formula
 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CHCH}_3)\text{COOH}$.

<220>

<221> SITE

<222> (1), (2), (4)

<223> In the formula $\text{COOHCH}_2\text{CH}(\text{CHCHC}_2\text{H}_4\text{SH})\text{OH}$, the carboxylic group is bonded with the amino group of the first amino acid Val, the hydroxyl group is bonded with the carboxylic group of the fourth amino acid Val, and the SH group is bonded with the SH group of the second amino acid Cys via a disulfide bond.

<400> 5

Val Cys Xaa Val

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/15, A61P35/00, 13/08, 43/00, C12Q1/02, 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/58, C12Q1/02-1/08, 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Caplus (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A P, X P, A	KOSUGI, Hiroshi et al., In vivo Effects of a Histone De-acetylase Inhibitor, FK228, on Human Acute Promyelocytic Leukemia in NOD/Shi-scid/scid Mice, Japanese Journal of Cancer Research, 31 May, 2001 (31.05.01), Vol.92, No.5, pages 529 to 536 PIEKARZ, R.L. et al., Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report, Blood, 01 November, 2001 (01.11.01), Vol.98, No.9, pages 2865 to 2868 (abstract), MEDLINE[online]: Retrieved from STN, MEDLINE Accession No.2001568142	4-6, 10-12, 20-22, 24 1-3, 7-9, 17-19, 23 4-6, 10-12, 20-22, 24 1-3, 7-9, 17-19, 23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 November, 2002 (26.11.02)Date of mailing of the international search report
10 December, 2002 (10.12.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08355

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WANG, Ruoxiang et al., Fungal metabolite FR901228 inhibits c-Myc and Fas ligand expression, Oncogene, 24 September, 1998 (24.09.98), Vol.17, No.12, pages 1503 to 1508	25-33 34
X A	KOMATSU, Yasuhiko et al., Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31, a Potent Synthetic Histone Deacetylase Inhibitor with Antitumor Activity, Cancer Research, 01 June, 2001 (01.06.01), Vol.61, No.11, pages 4459 to 4466	25-33 34
X A	HAN, Jeung-Whan et al., Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, Inhibits Proliferation of Tumor Cells via Induction of p21 ^{WAF1/Cip1} and Gelsolin, Cancer Research, 01 November, 2000 (01.11.00), Vol.60, No.21, pages 6068 to 6074	25-33 34
X A	EP 1010705 A1 (Japan Energy Corp.), 21 June, 2000 (21.06.00), Especially, see page 13, Par. No. [0050] and Test Examples. & AU 9888885 A & AU 732299 B & KR 2001023449 A & NO 200002045 A & NZ 503061 A & US 6399568 B1 & WO 99/11659 A1 & ZA 9808023 A	25-33 34
A	UEDA, Hiotsugu et al., FR901228, A novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No.968 III. Antitumor activities on experimental tumors in mice, The Journal of Antibiotics, 25 March, 1994 (25.03.94), Vol.47, No.3, pages 315 to 323	1-12,17-24
P,A	JP 2001-348340 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 December, 2001 (18.12.01), Particularly, Claims; example 2 (Family: none)	1-21,17-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08355

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 to 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Requirement of unity of invention in international application (PCT Rule 13.1) is not fulfilled unless there is a technical relationship in a group of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical feature" means a technical feature that defines a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2).

In the claims, the matter common to (1) the inventions relating to remedies for prostatic cancer as set forth in claims 1 to 3, 7 to 9, 17 to 19 and 23, and (2) the inventions relating to (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. .


PCT/JP02/08355

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

remedies for malignant lymphoma other than T cell lymphoma as set forth in claims 4 to 6, 10 to 12, 20 to 22 and 24, resides in "FK288 having an antitumor activity *in vivo*". However, it had been publicly known that FK228 (FR901228) has an antitumor activity on specific tumor *in vivo*, as reported in, for example, The Journal of Antibiotics, March, 1994, Volume 47, Number 3, pages 315-322 and Japanese Journal of Cancer Research, May 2001, Volume 92, Number 5, pages 529-536. Thus, it can be concluded that there is no "special technical feature" common to (1) and (2) as described above.

It is obvious that (3) the inventions relating to the evaluation of the antitumor effect by measuring a change in the expression of a specific gene/protein due to a histone deacetylase inhibitor as set forth in claims 25 to 34 has no "special technical feature" common to the inventions of (1) or (2).

Such being the case, the claims have three groups of inventions (1) to (3) as described above which are different from each other.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K38/15, A61P35/00, 13/08, 43/00, C12Q1/02, 1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K38/00-38/58, C12Q1/02-1/08, 1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN) MEDLINE (STN) EMBASE (STN) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG) JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	KOSUGI, Hiroshi et al., <i>In vivo</i> Effects of a Histone Deacetylase Inhibitor, FK228, on Human Acute Promyelocytic Leukemia in NOD/Shi- <i>scid/scid</i> Mice, Japanese Journal of Cancer Research, May 31, 2001, Volume 92, Number 5, pages 529-536	4-6, 10-12, 20-22, 24 1-3, 7-9, 17-19, 23
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 26.11.02	国際調査報告の発送日 10.12.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生  電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X P, A	PIEKARZ, R.L. et al., Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report, Blood, November 1, 2001, Volume 98, Number 9, pages 2865-2868 (abstract) MEDLINE [online]: Retrieved from STN, MEDLINE Accession No. 2001568142	4-6, 10-12, 20-22, 24 1-3, 7-9, 17-19, 23
X A	WANG, Ruoxiang et al., Fungal metabolite FR901228 inhibits c-Myc and Fas ligand expression, Oncogene, September 24, 1998, Volume 17, Number 12, pages 1503-1508	25-33 34
X A	KOMATSU, Yasuhiko et al., Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31, a Potent Synthetic Histone Deacetylase Inhibitor with Antitumor Activity, Cancer Research, June 1, 2001, Volume 61, Number 11, pages 4459-4466	25-33 34
X A	HAN, Jeung-Whan et al., Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, Inhibits Proliferation of Tumor Cells via Induction of p21 ^{WAF1/Cip1} and Gelsolin, Cancer Research, November 1, 2000, Volume 60, Number 21, pages 6068-6074	25-33 34
X A	EP 1010705 A1 (JAPAN ENERGY CORPORATION) 2000.06.21 Especially, see page 13 [0050] and Test Examples. & AU 9888885 A & AU 732299 B & KR 2001023449 A & NO 200002045 A & NZ 503061 A & US 6399568 B1 & WO 99/11659 A1 & ZA 9808023 A	25-33 34
A	UEDA, Hirotugu et al., FR901228, A novel antitumor bi-cyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No.968 III. Antitumor activities on experimental tumors in mice, The Journal of Antibiotics, March 25, 1994, Volume 47, Number 3, pages 315-323	1-12, 17-24
P, A	JP 2001-348340 A (山之内製薬株式会社) 2001.12.18 (ファミリーなし) 特に、特許請求の範囲及び実施例2を参照。	1-12, 17-24

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 13-16 に記載の発明は、治療による人体の処置方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件（ＰＣＴ規則１３．１）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（ＰＣＴ規則１３．２）。

そこで、請求の範囲をみると、①請求の範囲 1-3, 7-9, 17-19, 23 に記載の前立腺癌治療剤に関連した発明と、②請求の範囲 4-6, 10-12, 20-22, 24 に記載の T 細胞リンパ腫以外の悪性リンパ腫治療剤に関連した発明とに共通する事項は、「FK 228 がインビゾにおいて（特別ページに続く）」

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄の続き

て抗腫瘍活性を有すること」である。しかしながら、FK228 (FR901228) がインビボにおいて特定の腫瘍に対し抗腫瘍活性を有していることは、例えば、The Journal of Antibiotics, March, 1994, Volume 47, Number 3, pages 315-323、Japanese Journal of Cancer Research, May, 2001, Volume 92, Number 5, pages 529-536 にも記載されているように公知であるから、上記①と②の間に共通する「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

また、③請求の範囲25-34に記載のヒストンデアセチラーゼ阻害剤による特定の遺伝子・蛋白質の発現変化を測定する抗腫瘍効果の評価に関連した発明は、明らかに、①又は②の発明との間に共通する「特別な技術的特徴」を有しないものである。

したがって、請求の範囲には、上記①～③の別異の3発明が包含されている。

THIS PAGE BLANK (USPTL